

Zellen als Träger für Bakterien

Gebiet der Erfindung

5

Die Erfindung betrifft mit Bakterien infizierte Zellen sowie deren Verwendung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, insbesondere zur Behandlung von Krebs.

10

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik.

Zu den neuen Ansätzen einer Therapie von bislang unheilbaren oder unzulänglich heilbaren Erkrankungen gehören die verschiedenen Möglichkeiten der Gentherapie und der Immuntherapie.

Bei der Gentherapie soll eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein gewünschtes Protein kodiert, durch geeignete Träger in das Zielgewebe transportiert werden, dort in Zellen eindringen und diese transduzieren zur Expression des gewünschten Proteins. Zahlreiche unterschiedliche technologische Ansätze zur Gentherapie wurden entwickelt und geprüft. Insgesamt gesehen sind jedoch die klinischen Ergebnisse dieser Prüfung der unterschiedlichen Ansätze insgesamt wie auch im Besonderen bei Tumorerkrankungen eher enttäuschend. Dies hat zum wesentlichen Teil technische Probleme als Ursache. So weisen die Träger für Nukleinsäuresequenzen eine zu geringe Zielzellspezifität auf, die Anzahl von Zellen, welche transduziert werden können, ist zu gering und die Stärke und die Dauer der Expression

des gewünschten Proteins ist für einen therapeutischen Effekt zu niedrig.

Eine etablierte Form der Immuntherapie ist die Immunisierung mit einem Antigen, die sogenannte Vakzinierung. Nach einer Immunisierung mit einem Antigen entstehen im Körper spezifische Antikörper und/oder spezifische zytotoxische Lymphozyten, welche prophylaktisch oder therapeutisch wirksam sind, beispielsweise gegen Infektionserreger. Seit einigen Jahrzehnten wird mit unterschiedlichen Ansätzen versucht, auch bislang unzulänglich behandelbare oder unheilbare Erkrankungen durch eine Vakzinierung zu behandeln. Im Vordergrund steht hierbei die Therapie von Tumorerkrankungen durch eine Tumorvakzinierung. Ziel ist, durch eine Tumorvakzine eine Immunantwort gegen den Tumor zu bewirken, welche zur Lyse von Tumorzellen und letztlich zur Elimination des gesamten Tumorgewebes führt. Mit den bislang geprüften unterschiedlichen Tumorvakzinen konnte bislang jedoch noch kein Durchbruch in der Tumortherapie erzielt werden. Ein wesentlicher Grund liegt in der sogenannten Immuntoleranz des Tumorträgers für seinen Tumor. So gelingt es mit einer Vielzahl von immuntherapeutischen Ansätzen zwar relativ gut, eine tumorspezifische T-Zellantwort zu induzieren, diese korreliert jedoch oft nicht mit der tumoriziden Wirkung (z. B. Thurner et al., J Exp Med 190:1669-1678 (1999)). Neuere Erkenntnisse deuten auf unterschiedliche Ursachen hin. Zu diesen gehören die zu geringe Penetration des Tumorgewebes durch spezifische T-Zellen (Mukai et al., Cancer Research 59:5245-5249 (1999)) und/oder eine Inaktivierung von T-Zellen innerhalb des Tumors (beispielsweise durch TGF- β oder durch Expression von negativ regulatorischen Markern wie B7-H1 im Tumorgewebe oder durch Stimulation von immunsuppressiv

wirkenden regulatorischen T-Zellen (Übersicht: Bach, Nature Reviews, 3:189-198 (2003)).

- In unterschiedlichen klinischen Phasen kommen derzeit mehrere Verfahren zur Tumorvakzinierung zum Einsatz, die häufig auf Dendritischen Zellen basieren (zusammengefasst in Bancherau et al., Cell, 106:271-4 (2001)). Die häufigste Art der Immunisierung mit Dendritischen Zellen umfasst die Aktivierung der Zellen ex vivo, deren Beladung („Pulsen“) mit Antigen (beispielsweise gereinigtem Protein, Tumorzellextrakt oder definierten Peptiden) und deren anschließenden Applikation. Alternativ werden auch Methoden verwendet, die eine Fusionierung von Zellen beinhalten. In diesem Fall werden beispielsweise bestrahlte Tumorzellen mit dendritischen Zellen durch geeignete Verfahren wie ein elektrisches Feld fusioniert und anschließend appliziert (Kugler et al., Nat Med 6:332-6 (2000)).
- Mit Hilfe von rekombinanten attenuierten Bakterien wie beispielsweise Salmonellen und Listerien als Träger für ausgewählte Tumorantigene wurde eine neue Methode entwickelt, diese Immuntoleranz des Patienten für seinen Tumor zu durchbrechen (DE 102 08 653; DE 102 06 325, noch nicht offenlegt). Der Mechanismus, über welchen diese Immuntoleranz durchbrochen werden kann, ist in allen Einzelheiten bislang noch nicht verstanden. Jedoch scheinen hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen die nach Injektion erfolgende Anreicherung von Bakterien wie beispielsweise von Salmonellen oder Listerien im Tumorgewebe und die dort durch diese Bakterien verursachte Entzündung. So ist bekannt, dass nach einer i.v. Gabe von Salmonellen es zu einer Anreicherung dieser Bakterien im Tumorgewebe

kommen kann. Kinetische Studien zeigten jedoch, dass in frühen Zeitpunkten nach einer i.v. Injektion von Bakterien nur wenige Bakterien im Tumorgewebe auffindbar sind und diese sich bevorzugt im Tumorgewebe herdförmig vermehren können. Werden somit nach i.v. Injektion größere Mengen an Bakterien im Tumor beobachtet, so leiten sich diese aus relativ wenigen Vorläufern ab (Mei et al., Anticancer Res 22:3261-6 (2002)). Für eine therapeutische Anwendung beispielsweise im Sinne einer Gentherapie mit Salmonellen als Genträger ist dieses jedoch ungünstig, da in diesem Fall keine gleichmäßige Besiedelung des Tumors erfolgt, sondern nur wenige Herde mit hoher Bakterienzahl entstehen.

Tumoren enthalten neben den eigentlichen Tumorzellen und dem Bindegewebe eine beträchtliche Anzahl von Leukozyten, im Besonderen von Lymphozyten (Tumor-infiltrierenden Lymphozyten; TIL) und von Makrophagen (Tumor-assoziierten Makrophagen; TAM). Es wird angenommen, dass die Tumorlokalisierung von Leukozyten durch Expressionsprodukte der Tumorzellen, im besonderen durch Cytokine, Endotheline sowie auch durch die Hypoxie beeinflusst wird (Sica et al., Int Immunopharmacol, 2: 1045-1054 (2002); Grimshaw et al., Eur J Immunol, 32:2393-2400 (2002)).

25

Die Funktion der im Tumor lokalisierten Leukozyten ist widersprüchlich. Besonders für TAM wurde eine antitumorale (Antigenpräsentation; Zytotoxizität; Funada et al., Oncol Rep, 10:309-313 (2003); Nakayama et al., AntiCancer Res 30 22:4291-4296; Kataki et al., J Lab Clin Med, 140:320-328 (2002)) wie auch eine das Tumorwachstum fördernde Aktivität (Sekretion von Wachstumsfaktoren; Förderung der Angiogenese und der Metastasierung; Leek und Harris J.,

Mammary Gland Biol Neoplasia, 7:177-189 (2002); verminderte Sekretion von zytotoxischen Zytokinen wie Il-1 alpha; Il-1beta; Il-6; TNF alpha; Kataki et al., J Lab Clin Med, 140:320-328 (2002)) nachgewiesen.

5

Seit längerem wurde versucht, durch die Verabreichung von zytotoxischen Lymphozyten, TIL, Natürlichen Killerzellen, Makrophagen oder Dendritischen Zellen das Tumorwachstum zu beeinflussen. Die klinischen Ergebnisse waren jedoch widersprüchlich (Faradji et al., Cancer Immunol Immunotherap, 33:319-326 (1991); Montovani et al., Immunology Today, 13:265-270 (1992); Ravaud et al., British J of Cancer, 71: 331-336 (1995); Semino et al., Minerva Biotec, 11:311-317, (1999)). Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Injektion von gering aktivierten Makrophagen zu einer Förderung, von stark aktivierten Makrophagen zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen kann (Montovani et al., Immunology Today 13:265-270 (1992)). Dabei scheint die Applikation aktiverter Makrophagen die Tumorlokalisation zu begünstigen (Fidler, Adv Pharmacol, 30:271-326 (1974); Chokri et al., Int J Immunol, 1:79-84, (1990)). Auch die Injektion von Leukozyten, welche in vitro mit einer Gensequenz kodierend für ein antitumorales Protein transduziert worden waren, erbrachten klinisch bislang keinen Durchbruch in der Behandlung von Tumoren (Hegé and Roberts, Current Opinion in Biotechnology, 7:629-634 (1996)). Im Rahmen dieser Versuche wurde jedoch gezeigt, dass Leukozyten aber auch andere Zellen, insbesondere Tumorzellen, nach i.v. Injektion das Tumorgewebe erreichen können (Shao J et al., Drug Deliv 2 (2001)), dass jedoch der weitaus größte Teil der applizierten Zellen in Normalgewebe wie Lunge, Milz und Leber ansiedeln (Adams J, Clin Pathol Mol Path 49:256-267 (1996)).

Technisches Problem der Erfindung.

5 Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, Mittel zu schaffen, mittels welcher die Zielzelllokalisation, insbesondere Tumorlokalisierung, von Mikroorganismen, welche für Wirkstoffe codierende fremde DNA enthalten, verbessern lässt.

10

Erkenntnisse und Grundzüge der Erfindung sowie Ausführungsformen.

15 Der Erfindung liegt die Erkenntnis zu Grunde, dass Makrophagen oder dendritische Zellen, welche in vitro mit Bakterien infiziert, d.h. beladen wurden, diese nach intravenöser Verabreichung in das Tumorgewebe transportieren, dass die Menge der in dem Tumor lokalisierten Bakterien nach i.v. Injektion von in vitro mit Bakterien beladenen Makrophagen deutlich höher war als nach i.v. Injektion einer entsprechenden Menge freier Bakterien, dass selbst infizierte heterologe Tumorzellen sich in Tumoren anreichern, und dass dieser Effekt auch dann bestehen bleibt, wenn die infizierten Zellen zuvor durch Bestrahlung inaktiviert wurden.

Wurden Makrophagen beispielsweise als Träger für Samonellen verwendet, so ließen sich in zwei unterschiedlichen 30 transgenen Tumormodellen (Lungentumormodell: Raf-transgene Mäus, Kerkhoff et al., Cell Growth Differ, 11:185-90 (2000), Brusttumormodell: Her-2 transgene Mäuse, Bouchard et al., Cell, 57:931-6 (1989)) 18 Stunden nach i.v.

Applikation der mit Salmonellen beladenen Makrophagen zehn mal mehr Salmonellen im Tumorgewebe nachweisen als nach i.v. Injektion einer entsprechenden Menge freier Salmonellen.

5

Ähnliches zeigte sich bei der Verwendung einer heterologen Tumorlinie. Die Tumorzellline 4T1 (ATCC Nr. CRL-2539) leitet sich aus einem Tumor des Brustdrüsengewebes von BALB/c Mäusen ab und wurde nach Infektion mit attenuierten 10 Listerien in dem beschriebenen Raf-Tumormodell (C57BL/6 Hintergrund) appliziert. Auch hier zeigte sich bei der Verwendung infizierter Zellen eine stark erhöhte Zahl von Bakterien im Tumorgewebe, die auch bei vorheriger Bestrahlung der Zellen bestehen blieb.

15

Grundsätzlich lassen sich diese überraschenden Beobachtungen somit auf beliebige Zellen ausweiten, soweit sich diese Zellen durch Bakterien infizieren lassen oder an diese Bakterien fest anhaften und damit Träger für diese 20 Bakterien sind. So zeigte sich beispielsweise in den o.a. Tumormodellen, dass die Lokalisation von Salmonellen im Tumorgewebe weitaus größer war nach i. v. Injektion von Tumorzellen, die infiziert waren mit Salmonellen als nach i. v. Injektion einer entsprechenden Menge freier 25 Salmonellen.

Bakterien besitzen insbesondere durch bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS), Zellwandbestandteile, Flagellen, bakterielle DNA mit immunstimulatorischen CpG 30 Motiven, die allesamt mit unterschiedlichen sogenannten Toll-Like Rezeptoren (TLR) auf Antigen-präsentierenden Zellen interagieren und diese somit stimulieren können, einen starken adjuvanten Effekt. Es ist daher zu erwarten,

dass eine Infektion von Zellen mit Bakterien und die Verbreichung dieser Zellen nicht nur eine verbesserte Anreicherung der Bakterien am Tumor bewirkt, sondern dass diese Infektion auch eine Entzündung und eine Verstärkung 5 der systemischen sowie lokalen Immunantwort zur Folge haben wird. Dadurch lässt sich diese Methode auch für eine Steigerung der lokalen Immunantwort im Rahmen einer Immuntherapie einsetzen.

10 Gegenstand der Erfindung sind somit Zellen eines Säugers, welche beladen sind mit Bakterien und die Verwendung dieser Zellen zur Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung.

Zellen im Sinne dieser Erfindung können beispielsweise 15 sein autologe, allogene oder xenogene Makrophagen, Lymphozyten, Dendritische Zellen oder Tumorzellen. Bei der Verwendung von Tumorzellen werden diese vorzugsweise derart bestrahlt oder mit einem Zytostatikum behandelt, dass ihre Teilungsfähigkeit blockiert ist. Derartige Zellen 20 werden vorzugsweise aus dem Blut oder aus Tumoren mit dem Fachmann bekannten Methoden isoliert. Zur Verwendung können jedoch auch kommen in der Kultur etablierte autologe, allogene oder xenogene Zellen, sogenannte Zell-Linien aus Normalgeweben oder aus Tumoren. Derartige Zell-Linien sind 25 beispielsweise von Zellbanken wie der amerikanischen Gewebezelbank (ATCC) in beliebiger Zahl und Art erhältlich. Desweiteren können auch Zellen zur Verwendung kommen, die durch dem Fachmann bekannte Verfahren modifiziert wurden. Modifikationen umfassen hier insbesondere genetische' Modi- 30 fikationen aber auch zusätzliche Beladung der Zellen wie z. B. mit Peptiden, Proteinen, pharmakologischen Wirkstoffen oder viralen Partikeln.

Beladung im Sinne der Erfindung ist die Adsorption von Bakterien an die Zelle, die Phagozytose der Bakterien durch die Zelle und/oder die Infektion der Zelle.

- 5 Bakterien im Sinne der Erfindung sind beispielsweise gram-negative und grampositive Bakterien, vorzugsweise fakultativ intrazelluläre Bakterien, vorzugsweise Salmonellen oder Listerien, vorzugsweise solche Bakterien, welche teilungsfähig sind, jedoch keine Pathogenität für den Empfänger aufweisen oder in ihrer Virulenz attenuiert sind oder abgetötet sind. In der Virulenz attenuierte Bakterien sind beispielsweise dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Chromosom dieser Bakterien mindestens ein Gen für ein Stoffwechselenzym deletiert oder so mutiert ist,
- 10 15 dass das Stoffwechselenzym defekt ist. In diesen Bakterien kann i) ein Gen für ein Enzym zur Synthese von aromatischen Aminosäuren im Chromosom deletiert sein, beispielsweise das *aroA* Gen, welches für das erste Enzym in der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren kodiert, so dass
- 20 25 30 diese Bakterien in ihrem Wachstum abhängig sind von der Anwesenheit aromatischer Aminosäuren ii) diejenigen Proteine, welche die Motilität der Bakterien ermöglichen, unbeeinträchtigt exprimiert werden, beispielsweise die Funktionsfähigkeit der Gene *iap* und *actA* erhalten ist, und iii) das Gen *trps* kodierend für tryptophanyl-tRNA-synthetase im Chromosom deletiert sein, wobei in diese Bakterien Plasmide eingeführt worden sind, iv) deren Replikation stabilisiert wurde durch einen geeigneten "Replication origin", beispielsweise durch ori pAMβ1 (Simon and Chopin, 1988), v) die das *trps* Gen kodierend für tryptophanyl-tRNA-synthetase enthalten, vi) die ein Gen für ein Endolysin, beispielsweise das Lysis Gen des Phagen A118 (*ply 118*; Loessner et al., 1995) unter der Kontrolle

eines im Cytosol von Säugerzellen aktivierbaren Promoters, beispielsweise des *actA* Promoters (*PactA*, Dietrich et al., 1998) enthalten, und vii) die mindestens eine Nukleotidsequenz kodierend für mindestens einen Wirkstoff 5 unter der Kontrolle eines in Bakterien oder in Säugerzellen aktivierbaren Promoters, enthalten, wobei die Aktivierung des Promoters zellunspezifisch, zellspezifisch, zellzyklusspezifisch, zoffunktionsspezifisch oder abhängig von Metaboliten, Arzneimitteln oder von der Sau- 10 erstoffkonzentration erfolgen kann.

Derartige Bakterien weisen durch den Verlust mindestens eines Gens für ein essentielles Stoffwechselprotein eine drastische Verminderung ihrer Virulenz beispielsweise 15 messen an ihrer *in vivo* Vermehrungsfähigkeit auf und zeigen trotzdem eine erheblich gesteigerte Bactofection, eine Lyse der Bakterien im Cytosol, eine Freisetzung der in den Bakterien enthaltenen Plasmide und eine stabile Expression des vom Plasmid kodierten Wirkstoffes. Ein solcher bak- 20 terieller Mikroorganismus enthält in aller Allgemeinheit eine fremde Nukleinsäuresequenz, welche für einen Wirkstoff codiert und optional unter der Kontrolle einer regulatorischen Nukleinsäuresequenz steht, wobei in der chromosomal DNA des Mikroorganismus eine natürliche und 25 für die Expression eines bakteriellen Enzyms codierende Nukleinsäuresequenz des Bakteriums entweder deletiert oder mit der Maßgabe mutiert ist, dass ein hieraus entstehendes Translationsprodukt nicht-funktionell ist, und wobei der Mikroorganismus keine fremde Nukleinsäuresequenz enthält, 30 welche für das Enzym codiert.

Beispiele für intrazelluläre Bakterien sind: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* strain BCG, BCG

substrains, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. avium* subspecies paratuberculosis, *Nocardia asteroides*, andere *Nocardia* species, *Legionella pneumophila*, andere *Legionella* species 5 *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, andere *Salmonella* species, *Shigella* species, *Yersinia pestis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, andere *Pasteurella* species, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *Brucella abortus*, andere *Brucella* 10 species, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii*.

Beispiele für Attenuierungen von Salmonellen sind:
Inaktivierende Mutationen in einem *pab* Gen, einem *pur* Gen, 15 einem *aro* Gen, *asd*, einem *dap* Gen, in *nadA*, *pncB*, *gale*, *pmi*, *fur*, *rpsL*, *ompR*, *htrA*, *hemA*, *cdt*, *cya*, *crp*, *dam*, *phoP*, *phoQ*, *rfc*, *poxA*, *galU*, *metL*, *meth*, *mviA*, *sodC*, *recA*, *ssrA*, *ssrB*, *sirA*, *sirB*, *sirC*, *inv*, *hilA*, *hilC*, *hilD*, *rpoE*, *flgM*, *tonB* oder *slyA*, und Kombinationen davon. Die inaktivierenden Mutationen der beispielhaft aufgeführten Gene 20 zur Attenuierung von Salmonellen sind dem Fachmann geläufig.

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren Zellen, welche 25 Träger von Bakterien sind, wobei in diese Bakterien Nukleinsäuresequenzen eingeführt worden sind, welche für ein Protein kodieren, wobei diese Proteine vorzugsweise Wirkstoffe zur Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung darstellen.

30

Derartige Proteine können beispielsweise sein: Antigene von Infektionserregern wie Viren, Bakterien, Mycoplasmen, Parasiten, Antigene spezifisch für Tumore, im Besonderen

Proteine kodiert von Oncogenen, Antikörper, Epitop-bindende Fragmente von Antikörpern und Fusionsproteine enthaltend mindestens ein Epitop- bindendes Fragment eines Antikörpers, gerichtet beispielsweise gegen ein Antigen 5 auf einer Tumorzelle, einem Lymphozyten wie beispielsweise einem T-Lymphozyten oder einer Endothelzelle wie beispiel-sweise einer Tumorendothelzelle, Enzyme, im besonderen Enzyme zur Aktivierung von inaktiven Vorstufen eines Ar-zneimittels wie beispielsweise eine β -Glucuronidase, eine 10 Phosphatase, eine Hydrolase, eine Lipase, Immunsuppressive Cytokine wie beispielsweise IL-10, Immunstimulierende Cy-tokine wie beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3 oder IL-6, Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren wie beispiel-sweise G-CSF, GM-CSF, M-CSF, FGF; VEGF oder EGF, oder 15 Inhibitorische Proteine für Cytokine, Chemokine, Interfer-one oder Wachstumsfaktoren.

Die Regulation der Expression dieser Gene in den Bakterien erfolgt durch geeignete Promotoren, wobei diese von den 20 Bakterien oder von Viren oder von Eukaryonten stammen und unspezifisch, zellspezifisch oder funktionsspezifisch ak-tivierbar sein können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Er-25 findung werden dem Gen Nukleinsäuresequenzen angefügt, welche die transmembrane Expression oder die Sekretion des von dem Gen kodierten Proteines durch das Bakterium er-möglichen. Beispiele für derartige sogenannte Signalse-quenzen sind in den Literaturstellen EP 1042495, EP 30 1015023 und Hess et al., PNAS USA 93:1458-1463 (1996) beschrieben.

- Gegenstand der Erfindung ist des Weiteren die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zelle für die Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Zellen verwendet, um eine Tumorerkrankung 5 oder eine Immunerkrankung zu behandeln. Hierzu kodiert das in die Bakterien eingefügte Gen ein Protein, welches i) tumorzytolytisch ist, ii) proinflammatorisch wirkt, iii) negativ regulierende Immunzellen inhibiert wie beispielsweise durch Inhibition von CTLA-4, von B7-H1 oder von 10 CD25 oder von TGF β , iv) immunsuppressiv wirkt oder v) eine inaktive Vorstufe einer zytotoxischen, immunmodulierenden oder immunsuppressiven Substanz in einen aktiven Wirkstoff verwandeln kann.
- 15 Zur Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung werden vorzugsweise 100 bis 10^9 Zellen verabreicht, welche vorzugsweise pro Zelle etwa 0,1. (im statistischen Mittel) bis 100 Bakterien tragen. Derartige Zellen werden lokal auf die Haut, in den Kreislauf, in eine Körperhöhle, in ein 20 Gewebe, in ein Organ oder peroral, rektal oder bronchial mindestens einmal verabreicht.
- Erkrankungen, bei welchen die erfindungsgemäßen Zellen verwendet werden, stellen beispielsweise Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, chronische Entzündungen und 25 Organverpflanzungen dar.
- Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1: Lieferung von *Salmonella typhimurium* 7207
durch infizierte autologe
Knochenmarksmakrophagen

- 5 1.1: Isolierung von Knochenmarksmakrophagen (MΦ).
Es wurden ca. 2-3 Monate alte BxB23, bzw. ca 2 Monate alte
MMTV/neu transgene Mäuse für die Isolierung von Knochen-
marksmakrophagen verwendet. Die Isolierung der Makrophagen
erfolgte nach folgendem Protokoll: i) Oberschenkelknochen
10 der Maus entfernen, ii) Knochen in Petrischale von
Weichteilen befreien und an beiden Seiten aufschneiden,
iii) Knochenmark mit 2 ml DMEM 10 (DMEM Gibco mit 10% FCS
Gibco, 2mM L-Glutamin Gibco, 50 µM β-Merkaptoethanol
Gibco) mit Hilfe einer Spritze in Bluecap mit DMEM 10
15 spülen, iv) Zentrifugation für 5' bei 1200 rpm, absaugen
und in 5 ml Differenzierungsmedium aufnehmen. Auf eine
Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml in Differenzierungsmedium
einstellen (DMEM 10 + 10 ng/ml GM-CSF (recombinant Mouse
Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor; RD Sys-
20 tems, Wiesbaden Cat.-Nr.:415-ML) und in 5 ml Portionen in
Nunc Kulturschalen (NUNCLON™, 58mm, NUNC Nr.:16955)
verteilen, v) 8 Tage bei 37°C und 10% CO₂ inkubieren, vi)
- 25 1.2: Infektion von Makrophagen mit *Salmonella typhimurium*
7207 (SL7207) in vitro.

Die an der NUNC-Zellkulturschale adhärierenden MΦ wurden
mit DMEM gewaschen und anschließend wurden mit einem
Zellschaber die adhärenten Zellen geerntet, gezählt und in
Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Infektion mit
30 SL7207 (Hoiseth S.K. et al., Nature 291:238-239 (1981))
erfolgte nach folgendem Protokoll: i) 37°C, 1h im Brut-
schränk: MOI (multiplicity of infection) 1:20, ii) 10^6
Makrophagen wurden in 2 ml Medium in einer NUNC

Zellkulturschale ausgesät und mit 2×10^7 Bakterien (MOI = 20) 1 h bei 37°C inkubiert, iii) anschließend waschen, iv) mit Gentamycin (Endkonz. 100 µg/ml (Sigma)) 1h, 37°C inkubieren, v) waschen, Zellzahl bestimmen, ausplattieren auf 5 Brain Heart Infusion (BHI)-Platten (Gibco) für die Auszählung der bakteriellen colony-forming units (CFUs)

1.3: Ergebnisse der Beladung von Makrophagen.

Bei einer MOI von 20 und einer einstündigen Beladungsdauer 10 lassen sich konstant ca. 10^4 Salmonellen in 10^5 Makrophagen nachweisen. Die Beladungsdichte blieb für 12 Stunden nach der Beladung annähernd konstant und zeigt keinerlei Proliferation der Bakterien.

15 1.4: Applikation von „in vitro“ mit SL 7207 infizierten Makrophagen in BxB23 und MMTV/neu Tumormäusen.

Es wurden $5 \cdot 15^5$ in vitro infizierte Knochenmarks-Makrophagen, suspendiert in 100µl PBS i.v. und pro Maus in die Schwanzvene von BxB23 bzw. MMTV/neu Tumormäusen 20 injiziert (die verwendeten Versuchstiere zeigten fortgeschrittene Tumorentwicklung, Alter ca. 12 Monate, bei den BxB23 Mäusen betrug die Lungenmasse durch die Lungen-tumoren 0,75 - 1,25g). Je nach Experiment wurde (durch Auszählung der CFUs bestimmt) pro Maus eine Bakterienzahl 25 von $3 - 5 \cdot 10^4$ S. typhimurium 7207 injiziert. Als Kontrolle wurden BxB23 und MMTV/neu Tumormäusen S. typhimurium 7207 i.v. ($2,5 \cdot 10^5$ Bakterien suspendiert in 100 µl PBS pro Maus) appliziert. Nach 18 Std. wurden die Tiere getötet und die CFU (ausplattiert auf BHI-Platten) 30 in der Lunge (BxB23) bzw. dem Tumor (MMTV) bestimmt. Verlaufsuntersuchungen der Infektion erfolgten in der Kontrollgruppe nach i.v. Injektion von S. typhimurium aroA 7207. Hierzu wurden mit dem gleichen Protokoll zu

unterschiedlichen Zeitpunkten die Bakterienzahl durch Bestimmung der CFUs untersucht.

1.5: Anreicherung von *S. typhimurium* 7207 in Tumoren nach
5 i.v. Injektion: In den tumortragenden Lungen von BxB23
Mäusen, als auch in Mammatumoren von MMTV/neu Mäusen wurde
nach Verabreichung von mit Salmonellen infizierten Makro-
phagen im Vergleich mit Tieren in der Kontrollgruppe, die
mit freien Salmonellen behandelt worden waren, 18 Stunden
10 nach der Infektion mehr als die zehnfache Menge an Salmo-
nellen nachgewiesen. Nach Injektion von Bakterien belad-
enen Makrophagen war die Anreicherung der Bakterien schon
18 Stunden nach der Injektion so hoch (Faktor 10 höher wie
bei der Injektion nackter Bakterien, siehe Fig. 1 und
15 zugehörige Tabelle), wie sie vergleichsweise in der Kon-
trollgruppe (d. h. nach Injektion der Bakterien alleine)
erst nach einigen Tagen (Tag 5 nach Infektion) erreicht
werden konnte. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Bakterien-
beladenen Zellen konnten demnach eine deutlich größere
20 Anzahl von Bakterien in einer wesentlich kürzeren Zeit in
den Tumor angereichert werden als es nach Injektion der
reinen Bakteriensuspension möglich war. Wurden an den
Tagen 1, 7, 14 nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen
die CFUs in den Lungen und den Organen bestimmt, so ergab
25 sich, dass in den Lungen der tumortragenden BxB23 Mäusen
die CFUs konstant hoch blieben oder zunahmen, während in
den Lungen der C57BL/6 Kontroll-Mäuse wie auch in den Mil-
zen der BXB23 Mäuse und der C57BL/6 Mäuse die CFUs deut-
lich unter die Werte in den jeweiligen Lungen sanken oder
30 nicht mehr nachweisbar waren (siehe Fig. 2 und Fig. 3,
sowie zugehörige Tabellen; Fig. 2 zeigt einen Vergleich
der CFUs in Lungen von (Lungen-) tumortragende BxB23 Mäuse
mit Lungen der Kontrolltiere C57BL/6, Fig. 3 einen

Vergleich der CFUs in den Mammatumoren und in der Milz von MMTV/neu Mäusen nach i.v. Injektion von 5×10^5 S.typhimurium).

5

Beispiel 2: Lieferung von L. monocytogenes durch infizierte heterologe Zellen

- 4T1 Zellen (ATCC CRL-2539) einer Tumorlinie aus einem Brustdrüsentumor von BALB/c Mäusen wurden mit dem attenuierten L. monocytogenes Stamm und einer MOI von 10 über einen Zeitraum von 1 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und freie Bakterien durch eine Stunde Inkubation in Anwesenheit von Gentamycin abgetötet. Die Bestimmung der CFUs ergab eine Beladung der Zellen mit 0,15 Bakterien pro Zelle. Die Zellzahl wurde auf 5×10^6 Zellen pro ml in PBS eingestellt. Zusätzlich wurde ein Teil der infizierten Zellen durch Bestrahlung inaktiviert. In tumortragende BxB23 Mäuse (Alter > 10 Monate) oder C57BL/6 Mäuse gleichen Alters wurden pro Maus 0,1 ml dieser Suspension [d.h. 5×10^5 infizierte Zellen (gemessene CFU Listerien: $7,3 \times 10^4$), $3,5 \times 10^5$ infizierte und bestrahlte Zellen oder (gezählte CFUs) $3,5 \times 10^5$ freie Listerien in jeweils 100 μ l PBS] i.v. injiziert.
- Bei der verwendeten Strahlendosis erfolgt eine über die CFU Bestimmung nachgewiesene Reduktion freier Bakterien um maximal 25%, wodurch sich im Falle bestrahlter Zellen rechnerisch eine Infektionsdosis von ca. $3,8 \times 10^4$ Bakterien ergab.

30

17 h nach der Infektion wurde die bakteriellen CFUs in der Lunge und Milz durch serielles Plattieren auf BHI Platten (Gibco) bestimmt (Detektionslimit 10 Bakterien pro Organ).

Dabei zeigten entsprechend der nachweisbaren CFUs in der Milz alle Tiere eine erfolgreiche Infektion. In den Lungen von tumortragenden BxB23 Mäusen wie auch von den C57BL/6 Kontroll-Mäusen war die Anzahl der CFUs nach Injektion der erfindungsgemäßen lebenden oder bestrahlten Zellen deutlich höher als nach Injektion der Bakteriensuspension, wobei die Bakterienanzahl nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen in den Lungen der tumortragenden BxB23 Mäuse im Vergleich zu den der Bakterienanzahl in den Lungen der C57BL/6 Kontroll-Mäusen deutlich erhöht war (Faktor 10). In der Milz waren in allen Gruppen erheblich mehr bakterielle CFUs nachweisbar als in der Lunge, jedoch konnte kein deutlicher Unterschied in der Zahl der bakteriellen CFUs nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen oder der Bakteriensuspension sowohl bei tumortragenden BxB23 Mäusen wie auch bei den C57BL/6 Kontroll-Mäusen nachgewiesen werden (siehe Fig. 4 und die zugehörige Tabelle).

Wie bereits in den o.a. Kontrollgruppen zu den Versuchen mit Makrophagen, beladen mit Virulenz-attenuierten S. typhimurium 7207, dargestellt, vermindert sich auch bei Virulenz-attenuierten L. monocytogenes innerhalb eines Zeitraumes von etwa 5 Tagen, maximal jedoch 14 Tagen nach Injektion sowohl der erfindungsgemäßen Zellen wie auch der reinen Bakteriensuspension die Anzahl der bakteriellen CFUs in der Milz wie auch in anderen, nicht tumorbelasteten Organen sowohl bei den tumortragenden BxB23 Mäuse wie auch bei C57BL/6 Kontroll-Mäusen auf Werte, welche deutlich unterhalb der Werte der CFUs in den Lungen der (Lungen-) tumortragenden BxB23 liegen.

Im Gegensatz hierzu bleibt in den Lungen der (Lungen-) tumortragenden BxB23 Mäusen die initial erhöhte Anzahl von

19

bakteriellen CFUs nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen über den gesamten Zeitraum zumindest bestehen oder nimmt sogar noch anfänglich zu, um erst nach einer längeren Plateauphase wieder abzusinken.

5

10

15

20

25

30

Tabelle 1: Bakterienzahl in Lungen oder Tumoren infizierter Mäuse 18 Stunden nach i.v. Injektion von infizierten Makrophagen oder freien Salmonellen.

Mauslinie	S.t. + Makrophagen			S. typhimurium		
	CFU	SEM	n	CFU	SEM	n
BxB 23 (Lunge)	9.000	3.600	3	0	0	2
MMTV Her (Tumor)	5.850	1.552	4	66	66	2

Tabelle 2: Vergleich der CFUs in Lungen von (Lungen-) tumortragenden BxB23 Mäuse mit Lungen der Kontrolltiere C57BL/6.

Tag	BXB23			WT C57\BL6		
	CFU	SEM	n	CFU	SEM	n
2	1.485	1.335	2			
3	1.255	229	7	700	600	2
4	910	210	2			
5	2.469	1.503	6			
7	4.499	1.694	6	500	400	2
14	2.900	1.700	2	750	250	2
18	2.225	975	2			

Tabelle 3: Vergleich der CFUs in den Mammatumoren und in der Milz von MMTV/neu Mäusen nach i.v. Injektion von 5×10^5 S.typhimurium aroA

Tag	Tumor			Milz		
	Log(CFU)	SEM	n	Log(CFU)	SEM	n
3	2,67	0,24	2	4,65	0,10	2
4	3,19	0,68	4			
18	3,20	0,20	2	2,14	0,06	2

Tabelle 4: Bakterienzahl in infizierter Mäuse 17 Stunden nach Infektion mit infizierten 4T1 Brusstumorzellen mit (irrad. Cells) oder ohne (inf. Cells) Bestrahlung mit 25 gray oder freien Listerien.

	BxB 23		C57BL/6		
	inf. Zellen	inf. bestrahlte Zellen	L. mon. aroA	inf. Zellen	L. mon. aroA
Log(CFU)	3,572	2,437	0,6344	2,601	0,4337
SEM	0,1333	0,5261	0,6344	0,01688	0,4337
n	3	3	3	3	3

Tabelle 5: Bakterienzahl in der Milz infizierter Mäuse 17 Stunden nach Infektion mit infizierten 4T1 Brusstumorzellen mit (irrad. Cells) oder ohne (inf. Cells) Bestrahlung mit 25 Gray oder freien Listerien.

	BxB 23		C57BL/6		
	inf. Zellen	inf. bestrahlte Zellen	L. mon. aroA	inf. Zellen	L. mon. aroA
Log(CFU)	5,224	2,934	4,045	4,37	4,57
SEM	0,1596	0,4338	0,9131	0,3023	0,2573
n	3	3	3	3	3

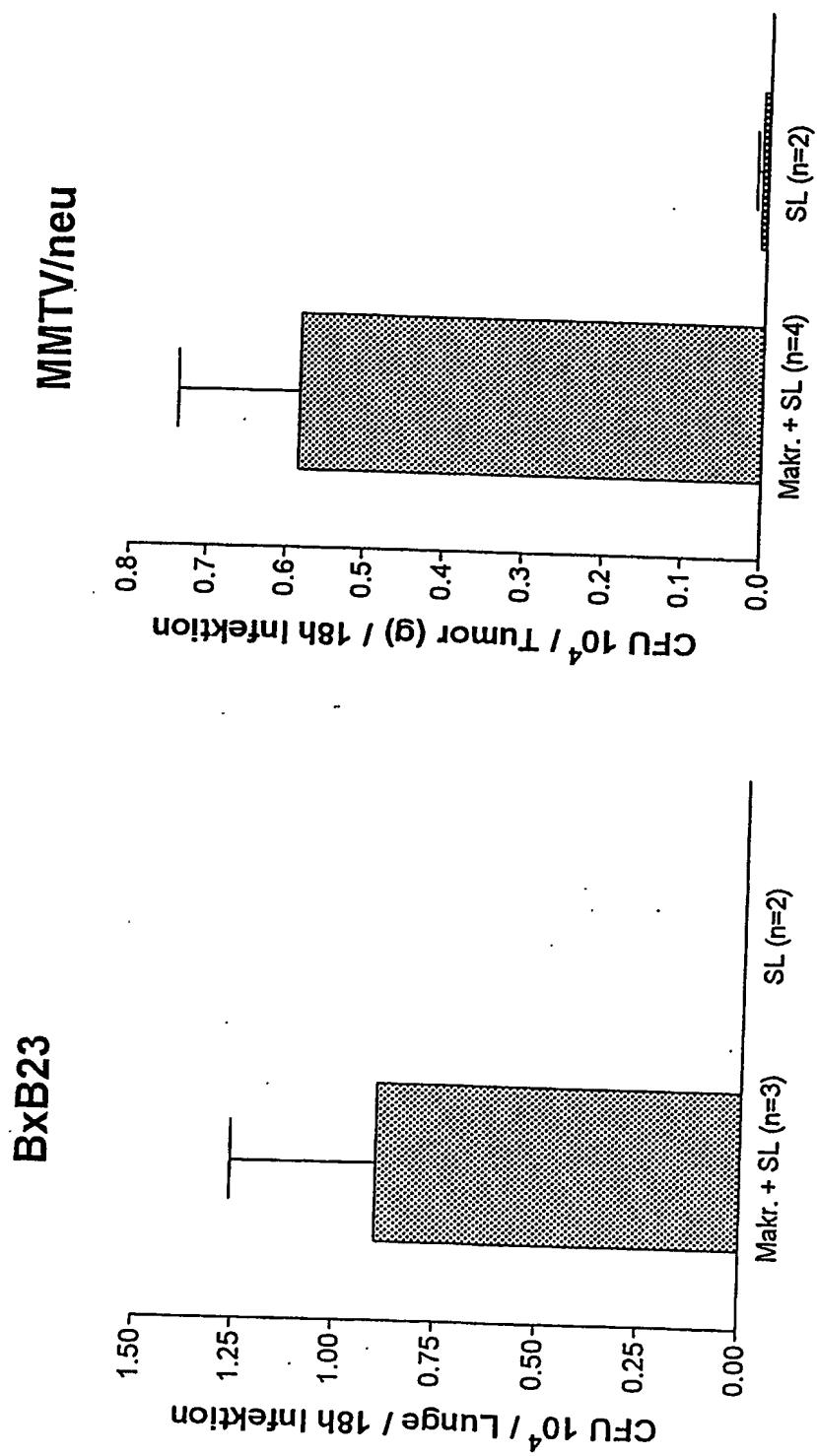
Patentansprüche:

- 1.) Zelle von Säugern, welche mit Bakterien beladen ist, zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei die Zelle autolog, allogen oder xenogen, und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Makrophagen, Dentritische Zellen, Granulozyten, Lymphozyten, Tumorzellen und Gewebezellen".
5
- 10 2.) Zelle nach Anspruch 1, welche durch Bestrahlung oder andere Methoden inaktiviert ist.
- 15 3.) Zelle nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Bakterien lebend, nicht virulent, in ihrer Virulenz attenuiert oder tot sind.
- 20 4.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Bakterien ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus "Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. bovis strain BCG, BCG substrains, M. avium, M. intracel-lailare, M. africanum, M. kansasii, M. marinum, M. ulcerans, M. avium subspecies paratuberculosis, No-cardia asteroides, andere Nocardia species, Le-gionella pneumophila, andere Legionella species, Salmonella typhi, S. typhimurium, andere Salmonella species, Shigella species, Yersinia pestis, Pas-teurella haemolytica, Pasteurella multocida, andere Pasteurella species, Actinobacillus pleuropneumo-niae, Listeria monocytogenes, L. ivanovii, Brucella abortus, andere Brucella species, Chlamydia pneumo-niae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci und Coxiella burnetii".
25
30

- 5.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Bakterien rekombinante DNA tragen, wobei die DNA für mindestens einen Wirkstoff kodiert.
5
- 6.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens ein Wirkstoff mit Hilfe geeigneter Promotoren durch die Bakterien selbst produziert wird oder dessen Expression unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promoters steht.
10
- 7.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Produktion intrazellulär, membranständig oder sekretiert erfolgt.
15
- 8.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei welchem der Wirkstoff ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Antigene von Infektionserregern wie Viren, Bakterien, Mycoplasmen, Parasiten, Antigene spezifisch für Tumore, im Besonderen Proteine kodiert von Oncogenen, Antikörper, Epitop-bindende Fragmente von Antikörpern und Fusionsproteine enthaltend mindestens ein Epitop-bindendes Fragment eines Antikörpers, gerichtet beispielsweise gegen ein Antigen auf einer Tumorzelle, einem Lymphozyten wie beispielsweise einem T-Lymphozyten oder einer Endothelzelle wie beispielsweise einer Tumorenterothelzelle, Enzyme, im besonderen Enzyme zur Aktivierung von inaktiven Vorstufen eines Arzneimittels wie beispielsweise eine β -Glucuronidase, eine Phosphatase, eine Hydrolase, eine Lipase, Immunsuppressive Cytokine wie beispielsweise IL-10, Immunstimulierende Cytokine
20
- 25
- 30

- wie beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3 oder IL-6, Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren wie beispielsweise G-CSF, GM-CSF, M-CSF, FGF; VEGF oder EGF oder Inhibitorische Proteine für Cytokine, Chemokine, Interferone oder Wachstumsfaktoren".
- 5
- 9.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei der Wirkstoff negativ regulatorische Elemente im Tumorgewebe blockiert.
- 10
- 10.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei die Bakterien als proinflammatorisches Stimulans in Tumorgewebe dienen.
- 15
- 11.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei Dendritische Zellen oder Makrophagen gleichzeitig als Träger für ein Impfantigen eingesetzt werden.
- 20
- 12.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei der Wirkstoff und/oder das Impfantigen ex vivo auf die Dentritische Zellen oder auf die Makrophagen beladen wird.
- 25
- 13.) Verwendung nach Anspruch 12), wobei das Impfantigen aus definierten Peptiden besteht.
- 30

- 14.) Verwendung nach Anspruch 10), wobei die Zelle fusioniert ist mit einer anderen Zelle, welche ein Gewebeantigen oder ein Tumorantigen exprimiert.
- 5 15.) Verwendung nach Anspruch 14, wobei die fusionierten Zellen autologe Tumorzellen sind.
- 16.) Verwendung der Zellen nach einem der Ansprüche 1) bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung.
10
- 17.) Verwendung einer Zelle, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 8, welche mit einem eine fremde DNA enthaltenden Mikroorganismus, insbesondere bakteriellen Mikroorganismus, beladen ist, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.
15
- 18.) Verwendung nach Anspruch 17, wobei die fremde DNA für einen definierten Wirkstoff kodiert und wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur Prophylaxe oder Behandlung einer Erkrankung bestimmt ist, welche mit dem Wirkstoff verhinderbar und/oder behandelbar ist.
20

Fig. 1

Bakterienzahl in Lungen oder Tumoren infizierter Mäuse 18 Stunden nach i.v. Injektion von infizierten Makrophagen oder freien Salmonellen.

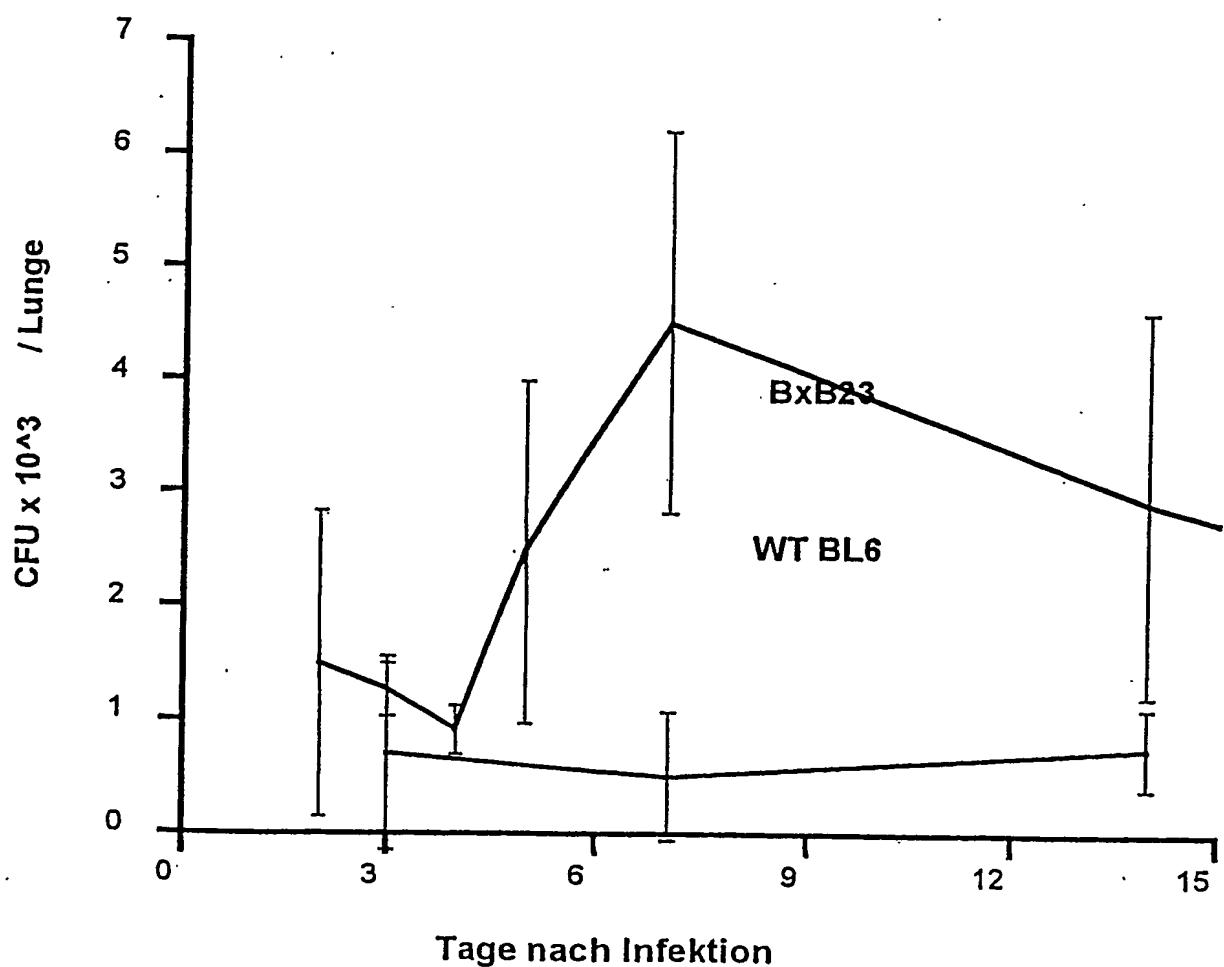
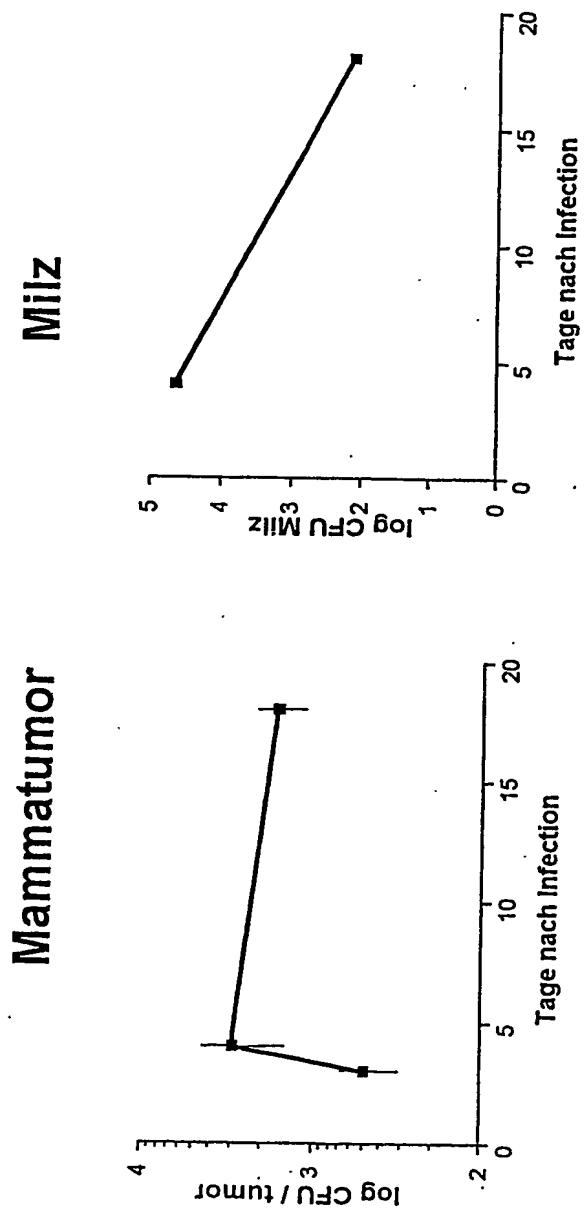
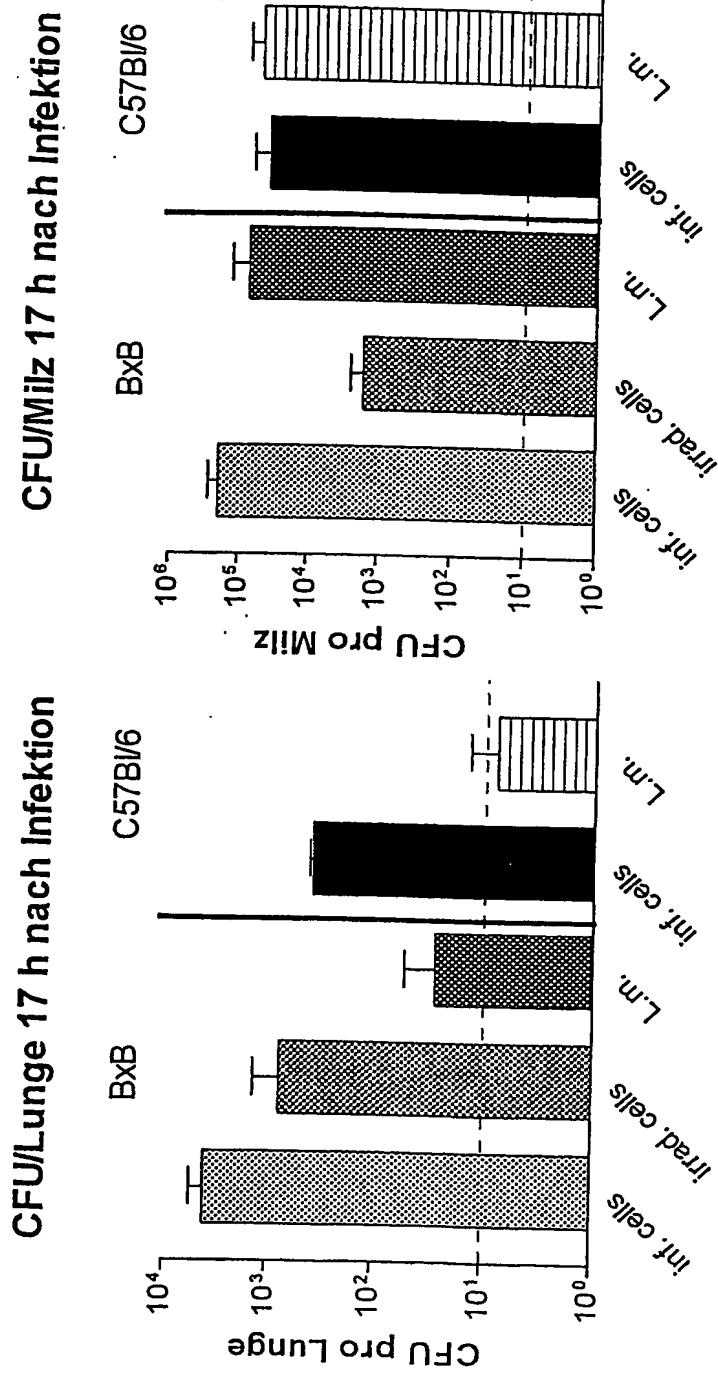
Fig. 2

Fig. 3

Vergleich der CFUs in den Mammatumoren und in der Milz von MMTV/neu Mäusen nach i.v. Injektion von 5x10⁵ S.typhimurium

Fig. 4

Bakterienzahl in Lunge oder Milz infizierter Mäuse 17 Stunden nach Infektion mit infizierten 4T1 Brusttumorzellen mit (irrad. Cells) oder ohne (inf. Cells) Bestrahlung mit 25 gray oder freien Listerien.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/001178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61K39/112 A61K39/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PASCAL, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/083879 A (ALIMENTARY HEALTH LTD ; O'MAHONY LIAM (IE); COLLINS JOHN KEVIN (IE)) 24 October 2002 (2002-10-24) page 15, lines 16-20; claims 12,28,29; example 6 -----	1-4,9-18
Y	US 2002/136738 A1 (AGREWALA JAVED NAIM ET AL) 26 September 2002 (2002-09-26) claim 4; example 3 -----	5-8
X	----- -----	1-4 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 October 2004

Date of mailing of the international search report

02/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lanzrein, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/001178

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PAN Z-K ET AL: "REGRESSION OF ESTABLISHED B16F10 MELANOMA WITH A RECOMBINANT LISTERIA MONOCYTOGENES VACCINE" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 59, no. 20, 1999, pages 5264-5269, XP000887367 ISSN: 0008-5472 figure 2; table 2</p> <p>-----</p>	5-8
Y	<p>PAWELEK J M ET AL: "TUMOR-TARGETED SALMONELLA AS A NOVEL ANTICANCER VECTOR" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 57, October 1997 (1997-10), pages 4537-4544, XP002939099 ISSN: 0008-5472 figures 1,2,5</p> <p>-----</p>	5-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE2004/001178

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-18 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/001178

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 02083879	A	24-10-2002	EP 1373475 A2	02-01-2004
			WO 02083879 A2	24-10-2002
			IE 20020243 A1	11-06-2003
			US 2002141977 A1	03-10-2002
US 2002136738	A1	26-09-2002	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/001178

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/112 A61K39/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PASCAL, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/083879 A (ALIMENTARY HEALTH LTD ; O'MAHONY LIAM (IE); COLLINS JOHN KEVIN (IE)) 24. Oktober 2002 (2002-10-24) Seite 15, Zeilen 16-20; Ansprüche 12,28,29; Beispiel 6	1-4,9-18
Y	US 2002/136738 A1 (AGREWALA JAVED NAIM ET AL) 26. September 2002 (2002-09-26) Anspruch 4; Beispiel 3	5-8
X	----- -----	1-4
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

22. Oktober 2004

02/11/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lanzrein, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/001178

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PAN Z-K ET AL: "REGRESSION OF ESTABLISHED B16F10 MELANOMA WITH A RECOMBINANT LISTERIA MONOCYTOGENES VACCINE" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, Bd. 59, Nr. 20, 1999, Seiten 5264-5269, XP000887367 ISSN: 0008-5472 Abbildung 2; Tabelle 2 -----	5-8
Y	PAWELEK J M ET AL: "TUMOR-TARGETED SALMONELLA AS A NOVEL ANTICANCER VECTOR" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, Bd. 57, Oktober 1997 (1997-10), Seiten 4537-4544, XP002939099 ISSN: 0008-5472 Abbildungen 1,2,5 -----	5-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/001178

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 1-18 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/001178

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02083879	A	24-10-2002	EP 1373475 A2 WO 02083879 A2 IE 20020243 A1 US 2002141977 A1	02-01-2004 24-10-2002 11-06-2003 03-10-2002
US 2002136738	A1	26-09-2002	KEINE	